

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体によるウリ科作物に 発生する病原ウイルスの検出

佐古 宣道・前田 孚憲*・川越 仁**

Susanto SOMOWIYARJO・三浦 猛夫**

(植物病理学研究室)

昭和63年10月31日受理

Detection of Causal Viruses in Cucurbit Plants Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies

Nobumichi SAKO, Takanori MAEDA, Hitoshi KAWAGOE,

Susanto SOMOWIYARJO and Takeo MIURA

(Laboratory of Plant Pathology)

Received October 31, 1988

Summary

One hundred and six cucurbit plants with foliar mosaic or the related symptoms collected from Miyazaki Prefecture in June and October 1987 were tested by three detecting methods; non-precoated indirect ELISA, double antibody sandwich ELISA, F(ab')₂ ELISA using monoclonal antibody to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) and polyclonal antibodies to ZYMV, watermelon mosaic viruses 1 and 2 (WMV-1, WMV-2), and cucumber mosaic virus (CMV). ZYMV was detected in 66 plants of *Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *Cucumis sativus*, *Luffa cylindrica* and *Momordica charantia*. Of these samples, 6 plants of *C. moschata* and *C. sativus* were doubly infected with WMV-1. CMV was detected in 25 plants of *Cucumis melo* collected in June, and in 3 plants of *C. sativus*. One plant of *C. maxima* was doubly infected with CMV and ZYMV. Six plants of *C. maxima* and *M. charantia* were infected with WMV-2 only.

ELISA test with monoclonal antibody to ZYMV (MCA-45) showed almost the same A₄₀₅ value as did the ELISA with polyclonal antibody to ZYMV for artificially inoculated plants as well as field samples. The results suggest that the MCA-45 for detecting ZYMV will be applicable as a tool of precise diagnosis and epidemiological study on ZYMV.

Key words: causal viruses in cucurbits, monoclonal and polyclonal antibodies.

緒 言

農作物に発生する植物ウイルスの診断方法として、病原ウイルスに対する抗血清を利用する

* 岡山大学資源生物科学研究所

** 宮崎県総合農業試験場

本研究は文部省科学研究費試験研究 1 (課題番号61860005) により行った。

方法があるが、多数の手法のうちで、ELISA 法が比較的迅速でかつ感度も良好であるから、最近よく利用されている。

従来、病原ウイルスに対する抗血清を作製するために、純化ウイルスをウサギなどの動物に注射し、全採血を行ってから血清中の抗体（ポリクローナル抗体）を採取する方法が用いられてきた。近年、マウスを使って、その抗体産生細胞を摘出してから、細胞融合法により抗体産生ハイブリドーマを作り、このハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法が新たに開発されている¹⁾。

本実験では、宮崎県下から採集したウリ科作物の病原ウイルスをモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いる ELISA 法で、類別することにより、このモノクローナル抗体の有用性を検討した。以下、得られた結果について報告する。

実験材料および方法

供試ウイルス 本研究室で継代保存中のズッキーニ黄斑モザイクウイルス（分離株169²⁾、ZYMV）を用いて、カボチャ（*Cucurbita maxima* Duch. 品種芳香青皮栗南瓜）で増殖させたのち、その罹病葉から搾汁液を調製して供試した。

ポリクローナル抗体と抗 γ -グロブリンの精製法 本研究室で作製し保存中の抗 ZYMV 血清³⁾、watermelon mosaic virus 1（分離株 M5, WMV-1）と watermelon mosaic virus 2（分離株 M18, WMV-2）に対する抗血清を用いた。 γ -グロブリンの精製は Clark と Adams⁴⁾が報告した方法により行った。精製した γ -グロブリン（1 mg）とアルカリフォスファターゼ（Grade 1, Boehringer Mannheim GmbH, 3,750U）をグルタルアルデヒド 1 段階法により結合させて、コンジュゲートを調製した。この原液を1,000倍に希釈して用いた。

モノクローナル抗体（MCA） ZYMV に対する MCA-45⁵⁾（イソタイプ IgG_{2b}）を用い、その精製は BALB/C マウスの腹水から、Protein A-Sepharose CL-4B カラムにより行った。精製した MCA のコンジュゲートは上記と同じ方法で調製し、得られた原液の5,000倍希釈液を供試した。

ELISA 法 間接 ELISA 法は前報⁵⁾に準じて行った。なお、コンジュゲートはポリクローナル抗体に対しては、アルカリフォスファターゼ標識アフィニティ精製抗ウキザ IgG(H+L) (KPL 社)ならびに MCA に対しては、同じ酵素標識アフィニティ精製抗マウス IgG+IgM(H+L) を用い、それぞれ1,000倍と5,000倍に希釈した液を供試した。

二重抗体法は同じく前報に準じて行った。供試したコンジュゲートは、前項に記載した方法によって調製したものであった。

これらの二種類の ELISA 法に用いた試料としての抗原液には、罹病カボチャ病葉の 1 g に対し、緩衝液を等量 (W/V) 加えて、磨砕、搾汁し、この搾汁液から同じ緩衝液で10倍段階に希釈した液を用いた。なお、間接 ELISA 法用の抗原液の調製には、0.05M炭酸緩衝液 (pH9.6)、二重抗体法用には0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.4, 0.15M塩化ナトリウムを含む)をそれぞれ使用した。

圃場から採取した罹病ウリ科作物の検定 1987年6月11日から12日、同年10月21日から23日の2回、宮崎県下のウリ科作物の栽培圃場から、モザイク病葉ならびにウイルス病様の症状を呈している葉を採集した。これらの葉を細断して、0.5 g～1 g ずつ小ビニール袋内に密封したのち、-80°C下で検定時まで保存した。試料の一部については、細断する前に DM 法によりウイルス粒子の有無を電顕下で観察したものもある。

ZYMV の検出には、MCA とポリクローナル抗体を用いる間接エリザ法および二重抗体法を用いた。WMV-1 および WMV-2 の検出には、ポリクローナル抗体による二重抗体法を使用した。キュウリモザイクウイルス (CMV) の検定は、 $F(ab')_2$ ELISA 法により前報⁹⁾に準じて行った。スカッシュモザイクウイルスおよびキュウリ緑斑モザイクウイルスが、病原ウイルスの疑いのあった試料については、それぞれの抗血清を用いる寒天ゲル内拡散法および DN 法による電顕観察によって検定を試みた。

なお、ELISA 法による検出の際には、上記の緩衝液を用いて、圃場試料から搾汁液を調製して、これを50倍に希釈した液を供試した。

実験結果

モノクローナル抗体 (MCA) を用いる ELISA 法による ZYMV の検出実験

本実験では、ZYMV 罹病カボチャ葉から調製した搾汁液を抗原液として、MCA と通常のポリクローナル抗体 (PCA) を用いる 2 通りの ELISA 法によりウイルスの検出実験を試みて、その感度などを比較検討した。

間接 ELISA 法を用いて得られた結果を示したのが、Fig. 1 である。罹病葉からの搾汁液の10

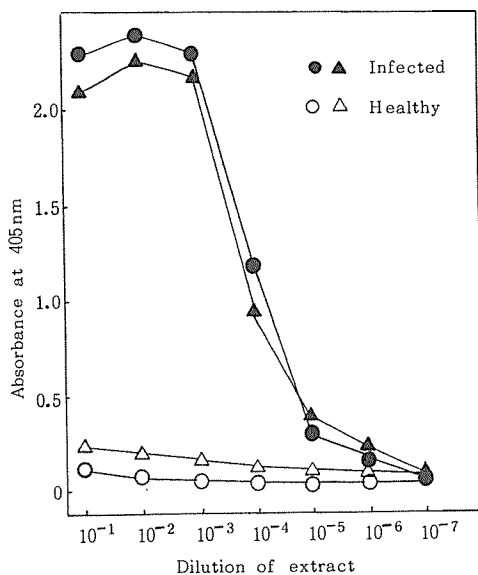


Fig. 1 Sensitivity of non-precoated indirect enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal (▲, △) and monoclonal (●, ○) antibodies for detecting zucchini yellow mosaic virus in crude extracts of pumpkin. Polyclonal and monoclonal antibodies were used as intermediate antibodies at concentration of 2 μ g/ml and 0.1 μ g/ml, respectively. Each point is the mean of three experiments using three wells in each experiment.

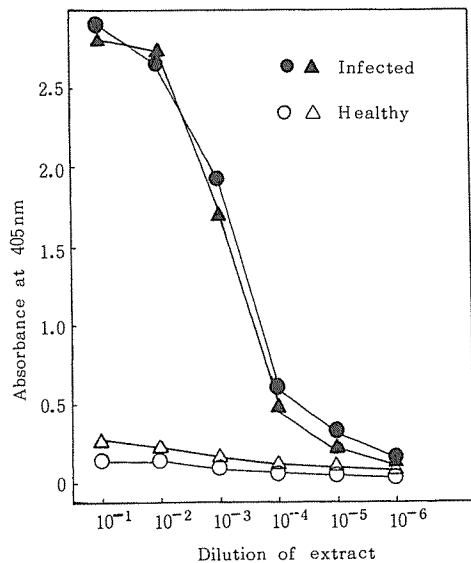


Fig. 2 Comparison of the sensitivity of double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal (▲, △) and monoclonal (●, ○) antibodies for detecting zucchini yellow mosaic virus in crude extracts of pumpkin. Antigen was immobilized on plates previously coated with polyclonal and monoclonal antibodies at concentration of 2 μ g/ml and 0.1 μ g/ml, respectively. The immobilized antigen was then reacted with conjugates prepared from polyclonal and monoclonal antibodies at dilution of 1,000 and 5,000, respectively. Each point is the mean of three experiments using three wells in each experiment.

倍から 10^3 倍希釈液で得られた A_{405} 値の比較では、MCA 区の方が PCA 区より若干高かったが、両抗体区の検出限界はそれぞれ 10^6 倍希釈液までで同一であった。しかし、健全カボチャ葉の搾汁液でみられる非特異反応値は、供試したすべての希釈液で MCA 区の方が PCA 区より低かった。

つぎに、二重抗体法を用いて得られた結果は Fig. 2 に示したとおりである。その結果、罹病葉からの搾汁液のすべての希釈液で、MCA および PCA 両区で得られた A_{405} 値の間には差はみられず、両区の検出限界も 10^6 倍希釈液までで同じであった。間接 ELISA 法で認められたような 10 倍希釈液での A_{405} 値の低下はみられなかったが、健全葉からの搾汁液での非特異反応値は、MCA 区の方が PCA 区より間接 ELISA 法の場合と同様に低かった。

宮崎県下での圃場から採取したウリ科作物の病原ウイルスの検定

1987年6月に宮崎県各地のウリ科作物の栽培圃場から採集した病葉および類似症状葉の64株について、PCA を用いる二重抗体法あるいは $F(ab')_2$ ELISA 法によって病原ウイルスの検定を試みた結果は、Table 1 に示したとおりである。その結果、病原ウイルスが ZYMV であると判定された株は、瓜生野町から採取した露地カボチャ（品種えびす）の13株、宮崎県総合農業試験場内の圃場からの日本カボチャ（品種宮崎早生）5株、高鍋町からのカボチャ（品種えびす）4株のうちの3株（残り1株は不明）、日本カボチャ（品種宮崎早生）3株の計6株、川南町のカボチャ（品種えびす）1株と日本カボチャ（品種宮崎早生）3株の計4株、小林市および清武町のカボチャ（品種えびす）各1株ずつ、合計30株であった。つぎに、WMV-1が検出された株は川南町から採取された日本カボチャ（品種宮崎早生）の3株のみであったが、これら3株からは上記のように ZYMV も検出されたので、両ウイルスによる重複感染株であると断定した。また、WMV-2が病原ウイルスであると判定されたものは、川南町から採取したカボチャ（品種えびす）の3株であった。CMV が検出された株は、小林市から採取されたメロン

（品種白雪、エリザベス、パパイヤ、アムスなど）の20株のうち19株（残り1株は不明）の他に、新富町からのメロン（品種エリザベス）8株のうち6株（残り2株は不明）および清武町からのキュウリ（品種不明）2株であった。

同年10月に宮崎県各地から採集した病葉などの42株についての検定結果を示した表が、Table 2 である。その結果、ZYMV が検出された株は、清武町からのキュウリ（品種は

Table 1. Detection of cucurbitaceous viruses in field samples collected in June 1987 from Miyazaki Prefecture by enzyme-linked immunosorbent assay

Districts	No. of samples infected by				
	ZYMV	WMV-1	WMV-2	CMV	Unknown
Kobayashi-shi 小林市	1	0	0	19	1
Uriuno-machi 瓜生野町	13	0	0	0	0
Miyazaki Agric. Expt. 宮崎総合農試	5	0	0	0	0
Takanabe-machi 高鍋町	6	0	0	0	1
Kawaminami-machi 川南町	4	3*	3	0	0
Shintomi-machi 新富町	0	0	0	6	2
Kiyotake-machi 清武町	1	0	0	2	0
Total	30	3*	3	27	4

* Doubly infected with ZYMV.

るな) 8 株のうち 7 株
(残り 1 株不明), 佐土
原町からのキュウリ
(品種シャープワン)
とカボチャ (品種えび
す) 各 1 株の計 2 株,
川南町からのカボチャ
(品種えびす) 2 株,
日本カボチャ 2 株 (病
原ウイルス不明はキュ
ウリ), 都農町からのカ
ボチャ 1 株と日本カボ
チャ 2 株 (品種はいず
れも同上), 日向市から
のカボチャ (品種同上)
3 株, ニガウリとキュ
ウリの各 1 株の計 5 株,
新富町からのカボチャ

2 株, キュウリ 4 株 (うち 1 株は WMV-1 との重複感染と判定), ヘチマ 1 株の計 7 株, 西都市
からのキュウリ 8 株 (うち 2 株は WMV-2 との重複感染と判定) の合計 36 株であった. WMV-
2 が病原ウイルスと判定された株は, 日向市から採取したニガウリの 3 株であり, CMV と判定
された株は日向市からのキュウリ 1 株と ZYMV との重複感染株であるカボチャ 1 株であった.

以上の結果についてウリ科作物別に 4 種類の病原ウイルスの検出件数をまとめて示したのが,
Table 3 である. この表から明らかなように, ZYMV の検出件数が 6 月と 10 月にカボチャ類と
キュウリで際立って多く, CMV の検出件数は 6 月の小林市からのメロン類で多かった. なお,
6 月に採集した CMV の血清型はすべて黄斑系 (Y 系統) と同じであると判定された. また,
6 月に採集した圃場試料には, スカッシュモザイクウイルスおよびキュウリ緑斑モザイクウイ
ルスは検出されなかった.

Table 2. Detection of cucurbitaceous viruses in field samples collected in October 1987 from Miyazaki Prefecture by enzyme-linked immunosorbent assay

Districts	No. of samples infected by				
	ZYMV	WMV-1	WMV-2	CMV	Unknown
Kiyotake-machi 清武町	7	0	0	0	1
Sadohara-machi 佐土原町	2	0	0	0	0
Kawaminami-machi 川南町	4	0	0	0	1
Tsuno-machi 都農町	3	0	0	0	0
Hyuga-shi 日向市	5	0	3	2(1)*	0
Shintomi-machi 新富町	7	1*	0	0	0
Saito-shi 西都市	8	2*	0	0	0
Total	36	3*	3	2(1)*	2

* Doubly infected with ZYMV.

Table 3. Cucurbitaceous viruses occurred in the different crops in Miyazaki Prefecture in June and October 1987^{a)}

Crops	No. of samples infected by									
	ZYMV		WMV-1		WMV-2		CMV		Unknown	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
<i>Cucumis sativus</i>	0	21	0	3*	0	0	2	1	0	2
<i>Cucumis melo</i>	0	NS**	0	NS	0	NS	25	NS	3	NS
<i>Cucurbita maxima</i>	30	13	3*	0	3	0	0	1*	1	NS
<i>Cucurbita moschata</i>										
<i>Luffa cylindrica</i>	NS	1	NS	0	NS	0	NS	0	NS	0
<i>Momordica charantia</i>	NS	1	NS	0	NS	3	NS	0	NS	0

a) I: Field samples collected in June 1987; II: Field samples collected in October 1987.

*Doubly infected with ZYMV.

**NS No samples.

MCA と PCA を用いる間接 ELISA 法による圃場試料の検定

本実験では、前項での検定試験の結果により病原ウイルスが ZYMV であると判定された試料について、MCA と PCA を用いる間接 ELISA 法により再度ウイルス検出を試みた。すなわち、超低温下で保存中であった試料から、キュウリ19株、カボチャ13株、ヘチマとニガウリ各1株の計34株を選び、検出試験により得られた A_{405} 値の平均値を算出した。その結果を示した表が Table 4 である。この結果では、MCA と PCA を用いた間接 ELISA 法により同一試料から得られた A_{405} 値は、ニガウリ以外では MCA を用いた時がやや高く、供試したいずれの試料でも、ZYMV が検出された。

Table 4. Comparison of sensitivity of non-precoated indirect enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal and polyclonal antibodies for detecting zucchini yellow mosaic virus in cucurbit plants collected from field.

Hosts	Average of A_{405} obtained using*	
	Monoclonal antibody	Polyclonal antibody
<i>Cucumis sativus</i>	2.121	1.687
<i>Cucurbita maxima</i>	1.231	1.160
<i>Luffa cylindrica</i>	2.350	1.755
<i>Momordica charantia</i>	0.524	0.626

* A_{405} obtained with healthy plants using monoclonal and polyclonal antibodies was 0.090 and 0.245, respectively.

考 察

本実験では、宮崎県各地のウリ科作物の栽培圃場から採取したウイルス病葉などの病原ウイルスの検定を血清学的手法を用いて行った。1987年に採集した圃場試料から検出された4種類の病原ウイルスのうち、potyvirus 群に属する3種のウイルスでは、6月と10月とも ZYMV の検出件数が際立って多かった。このような事例は諸外国の栽培圃場でも、それぞれの発生調査結果によりすでに確認されていて、その原因についても種々論じられているところである^{7, 8, 9, 10, 11, 12}。Potyvirus 群以外のウイルスとしては、今回の試料採集地区では山間部である小林市からのメロンに CMV が多発生していたことは特徴的であった。

これらの採集株が呈していたウイルスに起因すると考えられる病徴としては、モザイク、軽いモザイク、黄斑モザイク、黄化、黄脈黄化、葉脈透化、葉脈緑帯、退緑斑点、黄色斑点および奇形と実に多種多様の症状がみられ、肉眼による外部病徴の観察では、病原ウイルスの判定はまず不可能であったと言える。

したがって、血清学的方法を用いる ELISA 法などを利用して、病原ウイルスの検定試験を継続的に実施することが望まれる。

本実験のもう1つの目的としては、本研究室で作製した ZYMV に対する MCA-45 を用いた ELISA 法による検出精度を確認することであった。Fig. 1 および Fig. 2 に示したように、MCA-45 を用いた ELISA 法は PCA を用いた ELISA 法との比較結果では、検出限界などの感度の点では差はみられなかった。さらに、圃場から採集したウリ科作物の試料についての MCA-45 を用いた ELISA 法による検定結果は、PCA の ELISA 法によってえられた結果と全く同一であった。

したがって、この MCA-45 は感度および精度の点でも、通常の PCA との優劣がみられないので、研究室内での基礎的な実験のみならず ZYMV の疫学的試験にも耐えうるものと結論したい。

摘 要

1987年6月と10月に宮崎県下のウリ科作物の栽培圃場からモザイクならびに類似症状株として、106株を採集し、その病原ウイルスの検出を試みた。検出法にはズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)に対するモノクローナル抗体(MCA)と watermelon mosaic virus 1, 2(WMV-1, WMV-2) およびキュウリモザイクウイルス(CMV) に対するポリクローナル抗体を用いるELISA法を使用した。その結果、ZYMVがカボチャ、日本カボチャとキュウリなどの66株から検出され、そのうち日本カボチャとキュウリの6株はWMV-1と重複感染していた。CMVは6月に採取したメロン25株とキュウリ3株から検出され、さらにカボチャの1株がCMVとZYMVの重複感染であった。WMV-2はカボチャとヘチマの6株から検出された。MCA-45を用いるELISA法は人工接種の試料のみならず圃場試料でも、ZYMVのポリクローナル抗体を用いたELISA法で得られた A_{405} 値と同じ値を示した。この結果から、このMCA-45は圃場試料の診断法に使用できると考える。

引 用 文 献

- 1) Köhler, G. and C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells producing antibodies of pre-defined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- 2) 大津善弘・佐古宣道・S. Somowiyarjo (1985). 宮古・八重山群島から分離した zucchini yellow mosaic virus. 日植病報**51**, 234-237.
- 3) Somowiyarjo, S., N. Sako and F. Nonaka (1985). Application of non-precoated indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting zucchini yellow mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **51**, 569-575.
- 4) Clark, M. F. and A. N. Adams (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* **34**, 475-483.
- 5) Somowiyarjo, S., N. Sako and F. Nonaka (1988). The use of monoclonal antibody for detecting zucchini yellow mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **54**, 436-443.
- 6) Maeda, T. and N. Inouye (1987). Differentiation of two serotypes of cucumber mosaic virus in Japan by $F(ab')_2$ ELISA with cross-absorbed antibodies, *Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ.* **19**, 145-157.
- 7) Purcifull, D. E., W. C. Adlerz, G. W. Simone, E. Hiebert and S. R. Christie (1984). Serological relationships and partial characterization of zucchini yellow mosaic virus isolated from squash in Florida. *Plant Disease* **68**, 230-233.
- 8) Provvidenti, R. D. Gonsalves and H. S. Humaydan (1984). Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California. *Plant Disease* **68**, 443-446.
- 9) Nameth S. T., J. A. Dodds, A. O. Paulus and A. Kishaba (1985). Zucchini yellow mosaic virus associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. *Plant Disease* **69**, 785-788.
- 10) Lecoq, H. and M. Pirat (1985). Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. *Phytopathology* **75**, 890-893.
- 11) Nameth, S. T., J. A. Dodds, A. O. Paulus and F. F. Laemmlen (1986). Cucurbit viruses of California : an ever-changing problem. *Plant Disease* **70**, 8-11.
- 12) Davis, R. F., and M. K. Mizuki (1987). Detection of cucurbit viruses in New Jersey. *Plant Disease* **71**, 40-44.